

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Мартъянова Сергея Владиславовича
«Возможности управления формированием и функционированием микробных
биоленок на примере хемогетеротрофных бактерий из разных экотопов»,
представленную к защите
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 «Микробиология»

1. Актуальность темы диссертации

Биоплёнки как формы существования пространственно структурированных сообществ микроорганизмов, расположенных на границах раздела фаз, продолжают привлекать к себе интерес широкого круга исследователей. При этом особенно актуальным представляется исследование биоленок, формируемых бактериальными патогенами растений, животных и человека: находящиеся в их составе клетки характеризуются измененным фенотипом (наиболее часто – в результате индукции систем плотно-зависимой коммуникации), а также повышенной устойчивостью к антимикробным препаратам и эффекторам иммунной системы. По данным CDC (Center for Disease Control and Prevention; США) до 80% современных бактериальных инфекций связаны именно с моно- или полимикробными биоленками.

Указанные обстоятельства определяют актуальность разработки подходов к управлению формированием и функционированием бактериальных биоленок, что позволит приблизиться к созданию нового поколения лекарственных препаратов для терапии бактериальных инфекций. Другим потенциальным использованием подобного подхода может стать стимуляция образования биоленок промышленно-полезными микроорганизмами. По остроумному определению научного руководителя оппонируемой диссертации, д.б.н., профессора В.К. Плакунова и его соавтора – д.б.н. Ю.А. Николаева, биоленки – это своеобразные «города микробов» (https://elibrary.ru/download/elibrary_9490845_94992654.pdf), умение «расселять» или «основывать» которые является притягательной перспективой современной микробиологии.

Среди многообразия предлагаемых средств управления бактериальными биоленками значительный интерес представляет поиск подобной активности у химических соединений, уже нашедших свое медицинское применение. При этом очевидным преимуществом этого направления, обозначаемого термином «drug repositioning» (пер. с англ. – перенацеливание лекарств), является отсутствие необходимости проверки токсических, мутагенных и др. свойств тестируемых соединений, что существенно облегчает процесс перехода от их фундаментального исследования к практическому использованию.

В этой связи цель диссертационного исследования С.В. Мартъянова, обозначенная как изучение процессов управления формированием и биологической активностью микробных биоленок, включающее поиск широкодоступных агентов, представляется безусловно актуальной и соответствующей современным тенденциям развития микробиологической науки.

2. Достоверность и новизна результатов и выводов

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения и определяется достаточным количеством экспериментов и наблюдений, проведенных с применением современных микробиологических методов, адекватных целям и задачам диссертационного исследования. Наиболее грамотно спланированы и выполнены эксперименты по исследованию библиотеки из 1280 соединений, использование которых одобрено FDA (Food and Drug Administration; США). Обработка полученных результатов в большинстве случаев осуществлена с привлечением методов статистического анализа.

Оценивая новизну проведенного исследования, представляется необходимым выделить два ключевых момента:

1) На разнообразных моделях охарактеризован антибиопленочный эффект ряда предварительно отобранных соединений (4-гексилрезорцин, никлозамид, сульфотиазол), а также впервые обнаружена подобная активность у тилоксапола, бромида тонзония, клиохинола, пипемидовой кислоты, цефуроксима и азидотимидина.

2) Для большинства указанных соединений установлен молекулярный механизм биоактивности, определяемый подавлением транскрипции амилоиновых белков курли (основного белкового компонента межклеточного матрикса в биопленках многих грамотрицательных бактерий) или проявлением их действия как биосурфактантов, предотвращающих инициальный этап формирования биопленок.

3. Ценность полученных результатов для науки и практики

Диссертационное исследование Мартянова Сергея Владиславовича органично сочетает фундаментальный и практически ориентированный аспекты.

Полученные новые результаты о биологической активности известных лекарственных препаратов и консервантов определяют достаточно ясную перспективу проведения их клинических испытаний с последующим расширением показаний к применению отобранных соединений как средств терапии инфекционных заболеваний, важным элементом патогенеза которых является формирование бактериальных биопленок.

4. Содержание диссертации

Диссертация С.В. Мартянова изложена на 123 страницах машинописного текста, включающего введение; список работ, опубликованных по теме диссертации; обзор литературы; описание объектов и методов исследования; результаты собственных экспериментальных исследований; обсуждение, заключение и выводы. Диссертация иллюстрирована 5 таблицами и 31 рисунком, а также содержит список цитируемой литературы по обсуждаемому вопросу, включающий 237 научных источников.

Введение содержит обоснование актуальности проведенного исследования, включающие описание основных подходов к управлению бактериальными биопленками, формулировку цели и задач диссертационного исследования, ее научную новизну и практическую значимость, а также основные положения, выносимые на защиту и кратко раскрывающие суть полученного результата.

Обзор литературы хорошо структурирован и позволяет получить достаточно полные представления об известных ингибиторах возникновения и созревания бактериальных биопленок, а также об основных стратегиях поиска новых модуляторов роста биопленок. Имеющиеся замечание по данному разделу определяется спорностью подтверждения QS-контролируемого синтеза пигмента виолацеина у *Chromobacterium violaceum* на стр. 35 цитатой [Журина М.В., Кострикина Н.А., Паршина Е.А., Стрелкова Е.А., Юсипович А.И., Максимов Г.В., Плакунов В.К. Визуализация внеклеточного полимерного матрикса биопленок *Chromobacterium violaceum* с помощью микроскопических методов // Микробиология. – 2013. – Т.82 (4). – С. 502-509]. Более корректным представляется использование цитаты [McClellan K.H., Winson M.K., Fish L., et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*. 1997; 143(12): 3703-3711.]. Во-первых, именно в этой публикации детально представлены сведения о QS регуляции биосинтеза виолацеина; а во-вторых, публикация Журиной М.В. с соавт. посвящена не столько контролю биосинтеза виолацеина, сколько методам визуализации биопленки *C. violaceum*. Другое замечание связано с представлением на стр. 36 устаревших данных о механизме биоактивности растительного соединения иберина (цитата: «...иберин конкурирует с коротко- и среднецепочечными производными АГЛ за сайты связывания их с регуляторными белками»). В соответствии с современными представлениями эффект иберина заключается в нарушении функционирования внутриклеточной регуляторной сети Gac/Rsm [Tan SY, Liu Y, Chua SL, et al. Comparative systems biology analysis to study the mode of action of the isothiocyanate compound Iberin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(11): 6648-6659]. На стр. 40 антибиотик колистин ошибочно указан как «колисцин».

Для проведения экспериментальных исследований автором использован обширный перечень модельных объектов, критериями выбора которых служили способность образовывать детектируемые биопленки, а также фенотипическая близость к патогенным микроорганизмам. В свою очередь воздействие 4-гексилрезорцина, никлозамида и сульфотиазола на сапротрофы (*Kocuria rhizophila* DC2201, *Dietzia natronolimnaea* 2610-1, *Rhodococcus equi*, *Pseudomonas chlororaphis*), симбионты человека (*Kytococcus schroeteri* H01, *Staphylococcus aureus* MFP03, *S. aureus* 209P, *Micrococcus luteus* C01), и некоторые грамотрицательные условные патогены (*P. aeruginosa*, *C. violaceum*) было изучено с использованием классических и усовершенствованных соискателем методов биофильмологии, в то время как эффекты библиотеки химических соединений «Prestwick Chemical Library» были оценены в отношении *E. coli* K12 W3110 и уропатогенных штаммов *E. coli* EcoR-50, *E. coli* DSMZ 10650 с использованием наиболее современных протеомных и биоинформатических методов анализа. Указанное обстоятельство частично лишает оппонирующую работу внутреннего единства, поскольку результаты, полученные на разных объектах с использованием разных методов, сложно соотносятся друг с другом. В качестве замечания следует также указать, что упомянутые выше методы протеомного анализа и его статистическая обработка в тексте диссертации (стр. 53) никак не описаны и сведены только к упоминанию сотрудников Института им. Макса Планка, оказавших помощь при выполнении данного фрагмента работы.

Глава «Результаты» начинается с описания антибиопленочного эффекта 4-гексилрезорцина и никлозамида в отношении широкого круга модельных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. При этом их использование позволяло устранять стимулирующее действие сверхнизких концентраций азитромицина на формирование бактериальных биопленок, в то время как применение данных соединений в сочетании высокими дозами азитромицина приводило к синергидному ингибирующему эффекту. Установленные факты открывают перспективу создания «бинарных» препаратов, в составе которых антибиопленочный агент и антибиотик способны продемонстрировать улучшенные показания терапевтической эффективности. К настоящему моменту экспериментальные доказательства этого уже получены [Шемякин И.Г., Манзенюк О.Ю., Эль-Регистан Г.И., и др. Влияние 4-гексилрезорцина на эффективность антибиотикотерапии экспериментального сепсиса мышей, вызванного антибиотикоустойчивой *Klebsiella pneumoniae* // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2021. – Т.171 (4). – С. 469-472]. В качестве технического замечания к разделу следует указать на то, что Рисунки 2-6, раскрывающие результат совместного действия азитромицина и 4-гексилрезорцина на *D. natronolimnaea*, *K. rhizophila* и *R. equi*, имеют различный формат (разное количество частей, разное количество графиков в каждой части), затрудняющий сравнительную оценку представленного материала.

Наиболее безупречными являются результаты исследования библиотеки «Prestwick Chemical Library». По результатам первичного скрининга 1280 соединений были отобраны 6 соединений с наиболее выраженным эффектом на биопленкообразование *E. coli* K12 W3110; среди них - 1 биоцид широкого спектра действия (клиохинол), 2 антибактериальных соединения (пипемидовая кислота, цефуроксим), противовирусный препарат (азидотимидин), и 2 сурфактанта (тилоксапол, бромид тонзония). С использованием специально сконструированных бактериальных биосенсоров PcsG-egfp и PflC-egfp показано, что большинство данных соединений ингибируют экспрессию гена *csG*A (кодирует структурный белок фибриллы курли) и активируют экспрессию гена *fli*C (кодирует структурный белок жгутика), тем самым индуцируя переход бактериальных клеток от биопленочного фенотипа к планктонному. Последующий протеомный анализ подтвердил типичность подавления биосинтеза структурных белков курли (CsgA, CsgB, CsgC), среди тестируемых соединений отсутствующий только у клиохинола - для него данный эффект объяснен хелатирующими свойствами, в частности, связыванием ионов Fe (II).

Рассмотрение антибиопленочных агентов завершается описанием эффектов сульфотиазола. По спектру используемых модельных микроорганизмов и методам исследования данный раздел близок к аналогичным фрагментам об эффектах 4-гексилрезорцина и никлозамида, в связи с чем его расположение в тексте диссертации после результатов исследования библиотеки «Prestwick Chemical Library» представляется не логичным.

В свою очередь описание всех полученных результатов завершает раздел 3.2, обозначенный соискателем как «Действие пробиопленочных агентов». Как следует из дальнейшего текста диссертации, указанное название не может быть признано корректным. Представленные соединения – никлозамид и диметилсульфоксид не

оказывают детектируемого пробиопленочного эффекта (стр. 93: «...стимуляции роста биопленок никлозамидом у псевдомонад практически отсутствует»). Скорее речь должна идти о воздействии никлозамида и диметилсульфоксида на биосинтез пигментов-антибиотиков (феназинов и виолацеина), находящихся под положительным контролем систем «quorum sensing» и образуемых клетками дифференцированного биопленочного фенотипа. В рамках данного раздела соискателем обнаружены интересные, потенциально биотехнологически полезные эффекты, однако их объяснение является не полным и требует проведения дополнительных углубленных исследований.

В главе «Обсуждение» диссертантом последовательно проанализирован каждый из полученных фактов, определено их соответствие современному уровню научного знания в обсуждаемой предметной области.

Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, обоснованы и достоверны.

Текст диссертации завершается списком цитируемой литературы, включающим 19 отечественных публикаций и 218 иностранных публикаций. Несколько странным представляется присутствие в данном списке и собственный публикаций соискателя, ранее (на стр. 10) указанных среди работ, опубликованных по теме диссертации. Неочевидной является и допущенная соискателем практика самоцитирования (стр. 44-45; 90-91).

В то же время в целом существенных недостатков у оппонируемой работы не выявлено, а указанные замечания никак не умаляют значимость проделанной работы и не изменяют ее общую положительную оценку.

При общей положительной оценке работы у оппонента возникли следующие вопросы:

1) В выводе 2 никлозамид обозначен как ингибитор системы «quorum sensing» с одновременным указанием на то, что данное соединение способно стимулировать биосинтез антибиотиков-феназинов у *P. aeruginosa*. Как могут быть объяснены эти два взаимоисключающие эффекта, если учесть, что у *P. aeruginosa* синтез феназинового соединения пиоцианина находится под положительным контролем трехкомпонентной системы QS [Pierson L.S. 3rd, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 86(6):1659-1670]?

2) Каким образом стрессовый ответ и подавление образование биопленки модельным штаммом *Escherichia coli* K12 W3110 связаны между собой? Вывод 4 представляет эту связь как причинно-следственную (цитата: «...показано, что в основе антибиопленочного эффекта лежат разные типы стрессовых ответов»), в то же время подавление формирование амилоидных белков курли и развитие различных видов стресса могут являться параллельно протекающими процессами, где «после того» никак не означает «вследствие того».

5. Опубликование результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертации достаточно полно представлены в 15 печатных работах, в том числе 5 экспериментальных и 2 обзорных статьях в научных журналах «Микробиология» и «Applied and environmental microbiology», индексируемых в

международных базах научного цитирования Scopus / Web of Science и рекомендуемых ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований.

6. Содержание автореферата

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации, замечаний нет.

Заключение

Диссертационная работа Мартьянова Сергея Владиславовича «Возможности управления формированием и функционированием микробных биопленок на примере хемогетеротрофных бактерий из разных экотопов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение важной задачи, имеющей теоретическую и практическую значимость. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости работа и уровню проведенных исследований диссертационная работа в полной мере соответствует критериям, установленным для кандидатских диссертации «Положением о присуждении ученых степеней» (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, от 2 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 1 октября 2018 г. № 1168), а её автор – Мартьянов Сергей Владиславович заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Ведущий научный сотрудник

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий

Российской академии наук»,

доктор медицинских наук по специальности 03.02.03. - Микробиология, профессор

Дерябин Дмитрий Геннадьевич

460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, дом 29

Телефон: +7 903 221 39 63;

Адрес электронной почты: dgderyabin@yandex.ru

Подпись Дерябина Дмитрия Геннадьевича заверяю,

заместитель директора по науке

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Федеральный научный центр биологических систем и

агротехнологий Российской академии наук»,

доктор биологических наук

Е.А. Сизова



«03» 06 2021 года

М.П.